

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09280

研究課題名(和文) ヒト卵子老化の原因因子群における種特異的発現変化の解明と人為的卵子改良への応用

研究課題名(英文) Identification of factors responsible for human oocyte aging and establishment of methods to improve oocyte quality.

研究代表者

渡邊 誠二 (Watanabe, Seiji)

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：10241449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：現在も治療法のない染色体異常に対する抑制法の確立を目指し、ヒト成熟遅延卵子を老化卵子モデルとして用いて微小管重合促進剤により高頻度の染色体早期分離を人為的に抑制する方法を発見した。この現象には微小管ネットワークの細密化に加え、細胞周期蛋白GADD45A 転写上昇によるG2/M チェックポイントの活性変化、転写後調節による染色体接着蛋白リン酸化オーロラキナーゼの高発現が介在していた。また、受精後の胚盤胞形成率上昇にアクチン高発現に伴う細胞質分裂の正常化や呼吸量上昇が関与する可能性がヒト卵子と老齢マウス卵子で認められ、微小管重合促進剤処理が高齢女性卵子の染色体異常をも抑制する可能性が大きい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

女性の社会進出に伴い出産年齢が高まることで、卵子の染色体異常増加により流産や染色体異常児の出産が増加するのはよく知られた事実です。近年、少子高齢化対策として不妊治療が保険適用となりましたが、女性の加齢に伴う卵子老化現象は現時点で解決方法が無く、不妊治療の効果が頭打ちとなっています。私たちは卵子老化現象を人為的に抑える方法の手がかりを見出したことから、このメカニズムの詳細を明らかにし、臨床応用することで不妊に悩む高齢女性に対する治療成績を向上できると予想しています。

研究成果の概要(英文)：Our aim is establishment of methods to suppress chromosome aberrations in human oocytes. Recently, we discovered that a chemical which accelerates microtubule polymerization inhibited the high frequency of chromosome aberrations and increased blastocyst formation rate in human oocytes with delayed maturation.

These phenomena appear to be mediated by enhanced microtubule network formation, alteration of gene expression of a G2/M checkpoint relating protein (GADD45A) and an increased phosphorylation of a chromosome adhesion protein (Aurora kinase). In addition, the chemical also increased cytoplasmic division and oxygen consumption of aged mouse oocytes after fertilization, suggesting a probability that oocyte treatment with microtubule polymerization accelerators suppresses chromosome aberrations in oocytes obtained from women with infertility.

研究分野：生殖医学

キーワード：ヒト卵子老化 染色体異常

1. 研究開始当初の背景

ヒトでは、適齢期の自然妊娠出産率が約 23%と著しく低い上、母体加齢により 10%以下まで減少する。この現象の主因が、染色体異常を伴う不良卵子(老化卵子)にあることは申請者が在籍した旭川医科大学のチームが明らかにした(Kamiguchi 等,1994)。しかし、依然として卵子老化メカニズムの解明と克服は果たされておらず大きな課題である。なぜなら、臨床上特に入手が難しいヒト老化卵子の実験利用は不可能で、以後の卵子老化研究が国内外共にマウス卵子が中心となっているためである。既に、マウスの老化卵子でミトコンドリア機能低下、MPF 活性異常、紡錘体異常増加が報告されている。だが、染色体異常に限ればその増加は極僅か(数%)である(渡邊,2007)。更に、染色体分配を制御する中心体が哺乳類で唯一精子ではなく卵子に由来するというマウス卵子の特殊性は、染色体異常研究のためのヒト卵子の代替として疑問である。以上の観点から、申請者は「ヒト特有の卵子老化メカニズムが存在するはず」と考えヒト老化卵子の実験モデルを構築してきた。その結果、生殖医療の過程で得られる廃棄対象の成熟不良卵子(GV 卵子)がヒト老化卵子モデルとして有効(染色体分離異常>90%、正常発生率 3%)なことを見出した。更に、タキソール(TX)処理した老化モデル卵子において染色体分離異常抑制(>90% 7%)と胚盤胞発生率上昇(3% 16%)を確認した(Tanaka 等,2010)。すなわち、TX 処理及び未処理卵子を未老化及び老化卵子モデルとした比較研究が可能となり、ヒト卵子特有の老化因子の有効な探索ツールを確立した。これまでに、細胞周期蛋白、染色体分配・接着に関わるオーロラ蛋白とコヒーシン蛋白のヒト卵子特有の発現・配置変化を見出している。コヒーシン複合体は環状構造を成し、減数分裂に先立って複製された 2 本の DNA 鎖を互いに繋ぎ止めて分離するのを防止する。オーロラ蛋白は、複製により形成された 2 本の相同染色体同士を接着する。したがってこれらは染色体分配に直接影響すると考えられ、どのようなメカニズムで回復するのか興味深い。

2. 研究の目的

減数分裂期の TX 処理により改善した胚発生(特に桑実胚から胚盤胞への発育)の結果から、卵子老化は核における現象と細胞質における現象とに分けられることがわかる。核における現象は主に減数分裂過程での染色体分配、細胞質における現象は細胞骨格や細胞質内での代謝変化で主に受精後の胚発生に影響している。そこで、核においてはコヒーシン及びオーロラキナーゼ関連の動態が、細胞質においては受精後の細胞骨格変化とエネルギー代謝の変化が老化とどのように関連するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 染色单体や相同染色体同士の接着の主役であるコヒーシン蛋白は、複数のサブユニットの複合体で、体細胞分裂と減数分裂で組み合わせが異なることが知られている。そこで、複数のサブユニットタンパクをピックアップして蛍光免疫染色により発現及び局在を視覚的に明らかにし各サブユニットの老化への関与を検討した。

(2) オーロラ蛋白の作用を明らかにするため、合成蛋白をマイクロインジェクションシステムにより卵核胞期の核に注入し、一定時間培養した後にマイクロアレイで遺伝子発現変化を解析した。

(3) TX による発生能への効果を見るため TX 処理後に体外成熟させ、電気刺激により単為発生を誘発したマウス卵子においてマイクロアレイを行い、発現変化する因子を抽出した。さらに、胚の呼吸量を測定し代謝変化を検出した。

4. 研究成果

(1) TX 処理前後でオーロラキナーゼが遺伝子発現変化を起こさないにもかかわらず核に高発現することをすでに見出しており、オーロラキナーゼによる相同染色体の接着増強が転写後調節により誘導されていることをすでに確認していた。そこで、コヒーシンについて複数のサブユニットのタンパク発現を検出したところ、マイクロアレイで唯一発現上昇していた SMC1B にタンパク局在の変化は認められなかった。一方で、小塊を形成した Rad21 局在は消失し、TX による染色体分離異常抑制へのコヒーシンの関与が示唆された。これまで、減数分裂過程での染色体接着に主に関与すると考えられてきた REC8 は G2 期以後は転写もタンパク発現も検出されないことから、ヒトの減数分裂過程での機能はその発見の元になった酵母とは異なるかもしれない(図 1)。

(2) 合成オーロラキナーゼをマイクロインジェクションした卵子において TX 処理卵子と同等の遺伝子発現変化が得られるか比較した。その結果、TX 群と同様にチューブリンサブユニット及び G2/M チェックポイント因子 GADD45 の有意な発現上昇が認められオーロラキナーゼとこれらの因子が互いに調節を行なっている可能性が示唆された。一方で SMC1B の発現上昇は認められず、コヒーシンスブユニットの発現はオーロラキナーゼとは異なる経路の調節を受ける可能性が示唆された。

(3) 老齢マウスから得られた未成熟卵子を TX 処理後に成熟させて得られた卵子と未処理卵子を電気パルスにより刺激すると約 2 時間後に第二成熟分裂を完了し前核を形成した。この時、未処理群ではほとんどの卵子は、表層のアクチンネットワークの不良によると思われる細胞質の断片化を起こした。しかし、TX 処理の場合、卵子は良好な形態を保ったままに第二減数分裂を完了していた。この時に、卵細胞の酸素消費を比較したところ TX 処理群では有意に酸素消費が活発化し活性の高い卵子が見受けられた。マイクロアレイの Pathway 解析では脂肪酸合成経路が有意に低下すると同時に解糖系律速段階酵素の PFK1 の発現が低下して、解糖系と脂肪酸合成の抑制によって余剰となったアセチル CoA がミトコンドリアでの ATP 産生に利用されている可能性が示唆された。

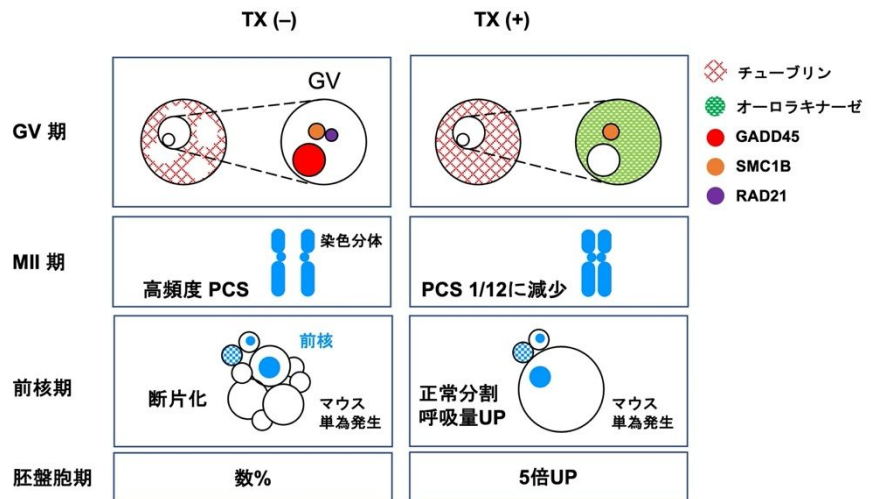


図 1 TX 処理による卵子老化現象への効果

以上の様に、TX 処理は卵子の核における染色体配列および細胞質内代謝を変化させ老化卵子の質を改善することが確認された。今後は、オーロラキナーゼおよびコヒーシンの染色体上への局在の変化を確認し、染色体分配異常抑制の直接的証拠を得たい。

< 引用文献 >

Kamiguchi Y, Tateno H, Mikamo K. Chromosomally abnormal gametes as a cause of developmental and congenital anomalies in Humans. Cong Anom.1994;34:1-12.

Tanaka A, Nagayoshi M, Awata S, Tanaka I, Watanabe S, Kusunoki H. The effect of taxol on predivision of sister chromatids and blastocyst formation in human IVM oocytes. Fertil. Steril.2010;94:S52

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 米本昌平、田中 温、渡邊誠二、大野基晴、市山卓彦、山口貴史、永吉 基	4. 巻 73
2. 論文標題 受精の異常	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床産婦人科	6. 最初と最後の頁 317-323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Atsushi Tanaka and Seiji Watanabe	4. 巻 2018
2. 論文標題 Can cytoplasmic donation rescue aged oocytes?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12252	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 A. Tanaka, M. Nagayoshi, I. Tanaka, T. Yamaguchi, T. Ichiyama, M. Ohno, S. Watanabe	4. 巻 110
2. 論文標題 Where does extra X in klinefelter syndrome come from?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fertility and Sterility	6. 最初と最後の頁 e292-e292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fertnstert.2018.07.824	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 A Tanaka, K Suzuki, M Nagayoshi, A Tanaka, Y Takemoto, S Watanabe, S Takeda, M Irahara, N Kuji, Z Yamagata, R Yanagimachi	4. 巻 110
2. 論文標題 Ninety babies born after round spermatid injection into oocytes: survey of their development from fertilization to 2 years of age	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fertility and Sterility	6. 最初と最後の頁 443-451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fertnstert.2018.04.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe S and Tanaka A	4. 巻 37
2. 論文標題 Effects of Taxol on the developmental potency of human and mouse GV oocytes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 i173-i173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/humrep/deac106.082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka A, Watanabe S	4. 巻 22
2. 論文標題 How to improve the clinical outcome of Round spermatid injection (ROSI) into the oocyte - Correction of epigenetic abnormalities-	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe S, Tanaka A	4. 巻 21
2. 論文標題 DNA damage in human sperm: The sperm chromosome assay	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe S, Fukui A, Nakamura R, Fukuhara R, Funamizu A	4. 巻 34
2. 論文標題 The inability of human sperm with chromosomal abnormalities to penetrate the oocyte in assisted reproductive technology (ART): risk factors and the role of seminal plasma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Mammal. Ova Res.	6. 最初と最後の頁 65-73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 渡邊誠二
2. 発表標題 ヒト成熟遅延卵子に対するタキソールによる質の改良とそのメカニズム
3. 学会等名 第159回弘前医学会例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊誠二
2. 発表標題 ヒト成熟遅延卵子に対する人為的な質の改良とそのメカニズム
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊誠二
2. 発表標題 ヒト成熟遅延卵子に起こる高頻度の染色体異常とその関連因子
3. 学会等名 第39回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊誠二
2. 発表標題 ヒト精子細胞における中心体数とROSIによる胚への影響
3. 学会等名 第38回日本受精着床学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S Watanabe
2. 発表標題 The risk of sperm and oocyte chromosome abnormalities in ART
3. 学会等名 The 21th Chongqing ART Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A Tanaka, M Nagayoshi, I Tanaka, T Yamaguchi, M Ohno, S Watanabe
2. 発表標題 Where does extra X in klinefelter syndrome come from?
3. 学会等名 ASRM 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊誠二、田中温、田中威づみ、大野基晴、市山卓彦、山口貴史、永吉基
2. 発表標題 X染色体STR解析を用いたクラインフェルター症候群(KS)患者の余剰X染色体の父母由来
3. 学会等名 第37回日本受精着床学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊誠二、福原理恵、横田恵、當麻絢子、山谷文乃、中村理果、横山良仁、田中温
2. 発表標題 ヒト卵子の染色体早期分離 (PCS) に関する遺伝子発現変化の検索
3. 学会等名 第37回日本受精着床学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊誠二
2. 発表標題 ICSIにおける精子染色体異常リスク
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第37回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊誠二、福原理恵、山谷文乃、横山良仁、田中 温
2. 発表標題 ヒト卵子の染色体早期分離（PSC）に関連する遺伝子発現変化の検索
3. 学会等名 第56回東北生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊誠二
2. 発表標題 ヒト成熟遅延卵子に対する人為的な質の改良とそのメカニズム
3. 学会等名 第73回染色体学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Watanabe S and Tanaka A
2. 発表標題 Effects of Taxol on the developmental potency of human and mouse GV oocytes.
3. 学会等名 ESHRE hybrid 38th Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 T Yamaguchi, K Kuroda, A Tanaka, S Watanabe	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 125
3. 書名 Treatment strategy of unexplained infertility and recurrent miscarriage	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------